

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-311198

(43) 公開日 平成7年(1995)11月28日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 33/561

27/447

33/543

G 0 1 N 27/ 26

3 3 1 Z

審査請求 未請求 請求項の数17 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平7-74615

(22) 出願日 平成7年(1995)3月7日

(31) 優先権主張番号 9 4 8 1 0 1 4 6 . 4

(32) 優先日 1994年3月8日

(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 390023146

チバーガイギー アクチエンゲゼルシャフ
ト

C I B A - G E I G Y A K T I E N G E
S E L L S C H A F T

スイス国 4002 バーゼル クリベックシ
ュトラーセ 141

(72) 発明者 ケース エンジンク

オランダ国, 9983 ペーアー ローデショ
ール, ホーイランドゼヴェーク 21

(74) 代理人 弁理士 萼 経夫 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み合わされたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための装置及び方法

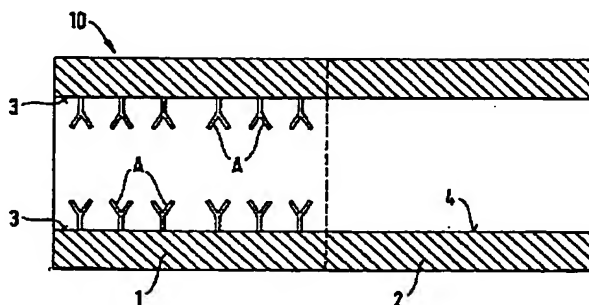
(57) 【要約】

【目的】 組み合わされたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための装置及び方法を提供する。

【構成】 分析物分子 (L, M) と分子認識要素 (A) との間のバイオアフィニティー相互作用が行われる第一ステージ (1) と、分析物分子 (L, M) の電気泳動分離及び次いで分離種の検出が行われる第二ステージ (2) との二つのステージを有する毛管系からなる組み合わされたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための装置 (10) であって、分子認識要素

(A) は第一毛管ステージ (1) の内側壁面 (3) に結合され且つ固定されている。

【効果】 容易に実施可能で自動化もでき、分析の精度及び感度が高い。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析物分子（L，M）と分子認識要素（A）との間のバイオアフィニティー相互作用が行われる第一ステージ（1）と、分析物分子（L，M）の電気泳動分離及び次いで分離種の検出が行われる第二ステージ（2）との二つのステージを有する毛管系からなる組み合わせられたコンバインドバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための装置であって、分子認識要素（A）は第一毛管ステージ（1）の内側壁面（3）に結合され且つ固定されていることを特徴とする装置。

【請求項2】 毛管系が、ほぼ環状、矩形状、不等辺四辺形状、又は同種形状の内部断面を有する請求項1記載の装置。

【請求項3】 毛管系が、第一ステージ（1）の長さ第二ステージ（2）の長さとの合計であり、約0.1cmないし約200cm、好ましくは約1cmないし約50cmである全長を有する請求項1又は2記載の装置。

【請求項4】 第一ステージ（1）の長さが、毛管系の全長の約1%～95%、好ましくは25%未満である請求項3記載の装置。

【請求項5】 毛管系が少なくとも一本の毛管からなる請求項1ないし4のうちの何れか一つに記載の装置。

【請求項6】 毛管系が、内側壁面（3）に結合された分子認識要素（A）を有する第一ステージ（1）である第一毛管と、電気泳動分離及び分離種の検出を行うために設けられた第二毛管との少なくとも二本の毛管からなり、これらは互いに接続されており、且つ好ましくはこれらの末端表面が一緒になって接着されている請求項1ないし5のうちの何れか一つに記載の装置。

【請求項7】 毛管（1）；（2）が溶融シリカからなり、且つ約 $5\mu\text{m}^2$ ないし約 $100000\mu\text{m}^2$ の断面積を有する請求項5又は6記載の装置。

【請求項8】 毛管系が、マイクロ機械加工により又はマイクロ電子工業において標準的な技術により、ガラス、ポリマー、又は半導体材料の小さなスラブ上に好ましくは平面的に設けられている請求項1ないし5のうちの何れか一つに記載の装置。

【請求項9】 毛管系を横切って電場を設けるための及び電気泳動的に分離された種のために検出器から信号を検出するための電極用電気的カップリングが、ガラス又は半導体材料のスラブ上に設けられている請求項8記載の装置。

【請求項10】 毛管系の第一ステージ（1）が、分子認識要素（A）が結合されている表面の制御された拡張が行われるように形成されており、そして分析物分子（L，M）の流動状態が予測可能に残っている請求項8又は9記載の装置。

【請求項11】 毛管系の第一ステージ（1）の内側壁面（3）が所定の荒さを有する請求項10記載の装置。

【請求項12】 毛管系の第一ステージ（1）が曲折形

状である請求項10又は11記載の装置。

【請求項13】 分子認識要素（A）が抗体、又は抗原、又は受容体、又は薬剤、又はDNAストランド、又は炭水化物、又は同種のもの、又はそれらの要素の二種若しくはそれより多くの混合物である請求項1ないし12のうちの何れか一つに記載の装置。

【請求項14】 一種又はそれより多くの分析物分子からなる分析物が、分析物分子（L，M）が第一毛管ステージ（1）中に存在するそれぞれの分子認識要素（A）により捕捉され、次いで予め決定された時間後に分子認識要素（A）から再び分離される第一毛管ステージ

（1）と、分析物分子（L，M）が毛管電気泳動により分離され、次いで最後に分析物分子の分離種が毛管系の末端部分で検出される毛管系の第二ステージ（2）との二つのステージを有する毛管系を通して移送される組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための方法であって、分析物分子（L，M）が、第一毛管ステージ（1）の内側壁面（3）に結合され且つ固定されている分子認識要素（A）により捕捉されることを特徴とする方法。

【請求項15】 分析物分子（L，M）が、毛管系の次の第二ステージ（2）中で濃縮される請求項14記載の方法。

【請求項16】 分析物分子（L，M）の濃縮が、等速電気泳動により、又は等電点電気泳動により、又は毛管系の第二ステージ内の電場に起因する場増幅された試料濃度により行われる請求項15記載の方法。

【請求項17】 分子認識要素（A）として、抗体、又は抗原、又は受容体、又は薬剤、又はDNAストランド、又は炭水化物、又は同種のもの、又はそれらの要素の二種若しくはそれより多くの混合物が使用される請求項14ないし16のうちの何れか一つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための装置（Device for combined bioaffinity assay and electrophoretic separation）に関するものである。本発明は、組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離を行うための方法にも関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来、バイオアフィニティーアッセイ及びより特別には免疫化学的方法は、主に低濃度で生物学的マトリックス中に存在する薬剤及びホルモンの定性及び定量分析のために使用された。大部分の内因性化合物は特定の抗原-抗体結合とは直接的に又は間接的に相互作用しないので、浄化工程はしばしば不必要である。生物学的マトリックスからの分析物の選択的なバイオアフィニティー抽出の重要な副次効果は、同時に分析物の相対的な濃度が得られるということである。抗体は、抗原分

3

子の小さな部分、所謂エピトープを認識するのみである。抗体に対して応答可能な前記エピトープを含む何れかの分子は、それが重要な分析物であるかのように結合するであろう。この効果は、分析物の親和力及び濃度と比較した場合の抗体に対する相対的親和力及び抗体分子の相対的濃度に大きく依存する。構造的な同族体の抗原-抗体結合における交差反応性は、単一の分析物が抗体と相互作用するであろうということでは、通常制御され得ない。分子認識要素の交差反応性の正の効果は、クロマトグラフィー的及び／又は分光学的分析方法を用いてオフライン又はオンラインの何れかで、分析物の予備濃縮のためにそれらは最近しばしば用いられるということである。

【0003】イムノアフィニティークロマトグラフィー (immuno affinity chromatography) と比較して異なる種類の選択性を得ることを意図して、免疫親和力と毛管電気泳動 (CE) とを組み合わせることが試みられた。分離のための他の物理-化学的性質の適用は、多くの場合、分析系の選択性の増大に寄与し得るので、CEの分解能は液体クロマトグラフィーと比較して大きい。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 バイオアフィニティーアッセイ (BA)、又はより特別には、CEと組み合わせられた免疫分析予備濃縮を使用するための公知の試みにおいて、抗体は、アミノプロピルトリエトキシシリル誘導化ガラスビーズの表面上に固定化された。1、4-フェニレンジイソチオシアネートを用いてガラスビーズの表面上が変性された後、モノクローナル抗体がそれにカップリングされた。ガラスビーズは、二つのガラスフリットの間の毛管内に充填された。毛管への塗布ガラスビーズの充填は、通常手によって行われる。この手順は非常に実施困難であり、且つ更に、非常に作業に敏感である。ガラスビーズを用いる充填毛管の一つの主な欠点は、毛管を閉塞する機会が劇的に増加されるということである。更に、毛管に充填されたガラスビーズ中の予測不能な及び不均質な流動状態に起因して、抗体に対する分析物分子の結合は不均一である。それ故、毛管内のガラスビーズの局在化に依存して、会合及び分離の動力学は異なる。しかしながら、溶液から抗体への分析物分子の物質移送における相違はピークの広がりを生じさせ得、これは装置の分解能の減少を生じさせる。

【0005】従来技術の状態は、続く毛管電気泳動を伴う抗原-抗体相互作用の方法例により説明されるけれども、それらの上記の確認された不利益は、一般的な分析物分子-分子認識要素相互作用の全ての類似した試みに対して言えるということを理解すべきである。前記の一般的な相互作用は、例えば、抗原-抗体複合化、受容体-薬剤相互作用、特異的な蛋白質-蛋白質相互作用、DNA-蛋白質相互作用、DNA-ハイブリッド化アッセイ及び更に別の類似の相互作用である。それ故、本発明

4

の目的は、それぞれの単一思想の利益を併有し且つ公知の試みの不利益を克服する組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び毛管電気泳動のための装置及び方法を提供することである。毛管内の分析物のための流動状態は、予測可能で且つ通常均質であるべきである。分析物分子-分子認識要素相互作用の会合及び分離の動力学の局在依存効果は、高い分離効率が達成され得るように避けられるべきである。

【0006】

10 【課題を解決するための手段】 全てのこれらの及び更に別の目的は、本発明の特徴を有する組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための装置及び方法により解決される。更に特別には、本発明は、分析物分子と分子認識要素との間のバイオアフィニティー相互作用が行われる第一ステージと、分析物分子の電気泳動分離及び次いで分離種の検出が行われる第二ステージとの二つのステージを有する毛管系からなる組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための装置であって、分子認識要素は第一毛管

20 ステージの内側壁面に結合され且つ固定されている装置を提供する。第一毛管ステージにおいて、分子認識要素は、例えば、毛管材料に対する吸着により又は共有結合により、内側の毛管壁面に結合され且つ固定されている。毛管の内側壁面に直接結合され且つ固定された分子認識要素を有することにより、分析物の流路内の障害物が避けられる。それ故、毛管を閉塞する危険は実質的に除去される。流動状態は予測可能であり、且つ毛管内の分析物の流動速度にのみ主に依存する。分析物分子-分子認識要素相互作用の会合及び分離の動力学の局在依存効果は避けられる。毛管の内側壁面に結合され且つ固定された分子認識要素は、例えば、抗体、抗原、受容体、

30 薬剤、DNAストランド、炭水化物、及び同様の更なる認識要素、又はそれらの要素の二種若しくはそれより多くの混合物である。内側の毛管壁面への分子認識要素の結合及び固定は、手作業が減少されるように自動的に容易に行われ得る。加えて前記自動化は装置の高い精度を生じさせ、それ故、これは同様に物質生産的であり得る。

40 【0007】本発明の好ましい態様においては、毛管系は、マイクロ機械加工により又はマイクロ電子工業において標準的な技術により、ガラス、ポリマー、又は半導体材料の小さなスラブ上に好ましくは平面的に設けられている。本発明の特別な態様は、所望により、電場を設けるための及び電気泳動的に分離された種のために検出器から信号を検出するための電極用電氣的カップリングさえも、ガラス、ポリマー、又は半導体材料のスラブ上に設けられ得るという利益を有している。分子認識要素は、毛管系の第一ステージの内側壁面に結合されている。分子認識要素を結合させるための十分に大きな表面を提供するために、毛管系の第一ステージの全長は、例えば、

50

内側壁面の制御された荒さを設けることにより、又は、不等辺四辺形状の流路を設けることにより、制御された方法で拡張されてよい。それ故、分子認識要素、即ち抗体が、毛管内にランダムに分散されたガラスビーズの表面に結合されているという状況にも係わらず、流動状態は制御可能であり且つ予測可能である。本発明の前記チップの態様の全長は非常に短い；殆どの前記チップ溶液は慣用の半導体ウェファの寸法を有し、且つ通常、一枚のウェファ上に多数のチップが同時に設けられ得るように、それらは相当に短い。このことは、本発明の装置の容易且つ安価な製造に寄与する。

【0008】本発明の組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための方法は、二つのステージを有する毛管系を通して分析物を流すことからなる。第一毛管ステージにおいては、分析物分子は前記ステージ中に存在するそれぞれの分子認識要素により捕捉される。より特別には、分析物分子は、例えば、毛管材料への吸着により又は共有結合により、前記毛管ステージの内側壁面に結合され且つ固定されている分子認識要素により捕捉される。予め決定された時間後に、分析物分子は分子認識要素から分離される。続いて、分析物分子は電気泳動により毛管系からなる第二ステージにおいて分離され、次いで最後に分離種は毛管系の末端部分で検出される。

【0009】

【実施例及び発明の効果】本発明は、添付図面を参照して下記の好ましい態様に関して更に詳細に説明されるであろう。図に関して、図1は、本組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための装置の説明図であり、そして図2-6は、本組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための方法の説明図である。

【0010】本発明の装置（通常、参照数10で示す）の実施態様を図1に模式的に示す。本発明の装置は、約0.1cmないし約200cm、好ましくは約1cmないし約50cmの長さであり、且つ約5 μ m²ないし約100000 μ m²の内部断面積を有する毛管系からなる。毛管系の内部断面の形状は、ほぼ環状、矩形状、不等辺四辺形状、又は同種形状であってよい。毛管系は、分析物及び担体媒体（必要ならば）の導入及び除去のための入口開口部及び出口開口部も含む。説明図の簡単化の理由のために、それぞれの入口開口部及び出口開口部は図1には示されていない。

【0011】毛管系は、分析物分子のバイオアフィニティー相互作用及び予備濃縮が行われる第一ステージ1、及び予備濃縮された分析物分子の電気泳動分離及び次いで分離種の検出が行われる第二ステージ2からなる。毛管系の第二ステージの縦伸びに沿って電場を形成するための電極は、図の簡略化のために示されていない。しかしながら、当業者は例えば、薄いワイヤー（これは、毛

管を通して伸び且つ毛管の外側に設けられた電氣的カップリングで終了する）と接続されている毛管の内側壁面4上の薄い金属リングのような前記電極のための種々の態様を知っているであろう。好ましい態様において、毛管系はガラス又は半導体材料の小さなスラブ上に形成される。前記の場合において、電極及びカップリングは、マイクロチップ工業において良く知られた製造技術を適用して“チップ”上に設けることができるであろう。

【0012】本発明に従って、第一毛管ステージ1において、分子認識要素Aは毛管の内側壁面3に結合され且つ固定されている。分子認識要素は、例えば吸着により又は共有結合により、毛管壁面に結合されてよい。しかしながら、他の物理的及び／又は化学的技術が同様に適用可能である。吸着的結合は通常容易に得られ、且つ毛管系の第一毛管ステージ1のバイオアフィニティー部分の再生のための可能性を理論的に残している。

【0013】毛管系が一本の毛管のみから形成されている場合には、第一毛管ステージ1は毛管の限定された長さのみを占有すべきであろう。それ故、毛管の限定された長さのみが分子認識要素Aにより占有されるべきであり、その結果、分子認識要素からの分離後に、分析物分子の実際の電気泳動分離のために毛管の充分な長さが利用される。第一ステージの長さを変えることにより、分子認識要素（これは、毛管壁面に結合され且つ固定されている）の量は容易に制御することができ、それ故、装置の感度を要求に適合させることができる。好ましくは、第一ステージ1の長さは、毛管系の全長の約1%ないし約95%、好ましくは25%未満である。図1において、及び続く図2-6において、第一ステージ及び第二ステージは破線により分離されている。

【0014】好ましい態様においては、毛管系は二本の毛管1、2からなる。第一毛管（これは、分子認識要素がその内側壁面3上のその長さ全体に沿って塗布されている）は、毛管2（これは、最適な分離状態を可能にする）に接合されている。それ故、各ステージの長さは容易に制御され、且つ要求に容易に合わせるができる。毛管系が二本の毛管1、2からなる場合には、図1-6中の破線は二本の毛管の末端部を表わしており、これに沿って、二本の毛管は互いに結合されており、且つ好ましくは一緒に接着されている。

【0015】図2-6において、単一の種類の分子認識要素A及び分析物分子の一種（これは、未標識分析物分子M及び標識分析物分子Lからなる）に対して、組み合わせられたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための方法が説明されている。分析物分子の部分の標識は、種々の方法により行われてよい。例えば、発光物質、紫外線照射物質、放射性物質、又は電気化学的活性物質が使用されてよい。本発明の方法の説明のために示された装置は、図1に示された一つに相当する。それは一本の毛管のみからなっていてよいし、又は、それは

二本又はそれより多くの毛管、例えば、分子認識要素Aがその内側壁面3に沿って塗布されている第一管1と毛管電気泳動の原理による分離を行うための第二管2、とからなっていてよい。図において、未標識分析物分子Mは小さな矩形により符号化されており、他方、L形状の符号は標識分析物分子Lを表わしている。分子認識要素Aは、毛管の注入側の内部の毛管壁面3の限定された長さに結合されている。

【0016】図2において、定義された濃度が示されている未標識分析物分子Mと標識分析物分子Lとの混合物は毛管系の第一ステージ1内に注入され、その結果、それらは毛管系の内側壁面上の分子認識要素Aと相互作用し得る。未標識分析物分子Mの濃度が増大するに連れて、標識分析物分子L（これは、分子認識要素Aにより捕捉される）の量は減少するであろう。適当なインキュベーション時間後に、標識分析物分子Lの結合フラクション及び遊離フラクションと、未標識分析物分子Mの結合フラクション及び遊離フラクションとの間に平衡が見出されるであろう。標準化された分析状態が保持される限り、非平衡状態も使用されてよい。

【0017】洗浄工程（これは、図3に示されている）において、標識分析物分子Lの非結合フラクション及び未標識分析物分子Mの非結合フラクションは毛管から除去される。

【0018】次工程（これは、図4に示されている）において、標識分析物分子Lの結合フラクション及び未標識分析物分子Mの結合フラクションは分子認識要素Aから分離される。チャオトロピック剤(chaotropic agent)、例えば塩溶液、有機溶媒又は他の緩衝溶液を注入することにより、分離速度は増大され得、且つ再会合が減少され得る。

【0019】次工程は、第二毛管ステージ2の内側の電場内での標識分析物分子Lと未標識分析物分子Mとの分離である。毛管電気泳動CEにおける分離効率は、とりわけ、注入された試料プラグの寸法に依存している。それ故、標識分析物分子L及び未標識分析物分子M（これらは分離工程後に、第一毛管ステージの長さにわたって広げられている）を濃縮することが好ましい。この濃縮は種々の方法により、例えば等速電気泳動により、又は等電点電気泳動により得られてよい。好ましくは、場増幅された試料濃度は、第二ステージ内の電場を使用して得られる。この目的のために、チャオトロピック剤並びに分析物分子L及びMを伴う試料の伝導度は、分離緩衝剤の伝導度よりも小さく選択される。次いで、分析物分子L及びMが帯電されるという条件下で、図5に示される如く、高い電場に起因して、それらは濃縮される。

【0020】この積み重ね効果は、毛管系（これは、図6に示されている）の第二ステージ内の分離効率のために、及び標識分析物分子Lの正確な定量のために本質的なものである。第一ステージがその内側壁面に結合され

た一種の分子認識要素Aのみからなり、且つ一種の標識分析物分子Lを有する場合には、標識分析物分子Lは選択的に検出され得、分離効率は主な役割を演じない。しかしながら、異なる分子認識要素及び標識を用いる複数分析物分析に対しては、分離効率は非常に重要であることは明らかである。

【0021】本発明の装置の実施態様（これは、第一ステージのその内側毛管壁面に沿って抗体が塗布されている）のみの説明の目的のために、後記本文が記載されている。

【0022】化学薬剤

20 mMのナトリウムテトラボレート緩衝液 pH=8.0 (BB8) を使用するための準備は、フルカ (Fluka) 社 [スイス国, ブーフス (Buchs)] から得ることができ、69 mMのナトリウム-カリウムホスフェート緩衝液 pH=7.0 (PB7) を使用するための準備は、チバーガイギー社 [スイス国, パーゼル (Basel)] から得ることができ、化学級のメタノール及びトルエン並びにミリキュー水 (milli-Q water) が使用されるべきである。アトラジン、2-エチルアミノ-4-クロロ-6-イソプロピルアミノ-1, 3, 5-トリアジン、アトラジンに対するモノクローナル抗体、及びアトラジンで標識されたフルオレセイン (FA) は、本出願人の内部源から得られる。ウシ血清アルブミン (BSA) は、フルカ (Fluka) 社 (スイス国, ブーフス (Buchs)) から得ることができ、且つ更に精製することなく使用してよい。

【0023】手段及び毛管電気泳動条件

フルオレセイン検出器又はUV検出器を備えた P/ACE 2100 エレクトロポログラフ [アメリカ合衆国, カリフォルニア, フラートン (Fullerton) のベックマンインスツルメンツ (Beckman Instruments) 社製] が使用される。488 nm 及び注文製の光学系で操作し、毛管の検出窓に配置された光学繊維の末端部で 5 mW を伝える 15 mW のアルゴンレーザー [アメリカ合衆国, カリフォルニア, マウント ビュー (Mt. view), スペクトラフィジクス (Spectra-physics) 社製] を、発光物質で標識された分析物分子の励起のために使用することができる。電気泳動分離は、例えば、毛管（これは 30℃ に保持され、注入は通常加圧により行われる）にわたって 20 ないし 30 kV を適用することにより行うことができる。

【0024】塗布手順

塗布毛管は、溶融シリカ毛管を 1M KOH を用いて 2 時間洗浄後、水を用いて 10 分間濯ぎ、次いで 0.1 M HCl を用いて 10 分間濯ぎ、次いで 200℃ で 3 時間乾燥（この間、毛管は窒素を用いてフラッシュされる）して注文製造される。（メルカプトメチル）ジメチルエトキシシラン [MDS; スイス国, ブーフス (Buchs) のフルカ (Fluka) 社製] を用いる塗布は、毛管壁面上の単一層を得るために、前記試薬を用いて毛管を充填し、次い

でそれを真空下で200℃のオープン中に18時間放置することにより行うことができる。

【0025】3-アミノプロピルトリメトキシシラン（ドイツ国、シュタインハイム(Steinheim)のアルドリッヒ(Aldrich)社製）を用いる塗布は、2%トルオール溶液を用いて毛管を充填し、次いで毛管を100℃で3時間加熱することにより行うことができる。その後、毛管をメタノールを用いて10分間濯ぐ。アミノプロピル塗布された毛管は、室温で4時間PB7中の0.5%グルタルアルデヒド（ドイツ国、ダルムシュタット(Darmstadt)のメルク(Merck)製）を用いて処理し、続いて毛管をPB7を用いて濯いだ後に、抗体及びBSAの共有結合のために使用することができる。

【0026】抗体の毛管への塗布は、抗体溶液（10μg蛋白質/ml）と毛管カップリングの場合はPB7との混合物を毛管に充填することにより、或いはエレクトロフェログラフ(electropherograph)による30又は60秒の間の加圧注入により、行われる。注入後、毛管を通る抗体のサイホンの吸出しを避けるために、室温での3時間のインキュベーションの間、毛管は水平に横たえられる。次いで、毛管にPB7中のBSA溶液（1-2mg/ml）を充填し、次いで非特異的結合を減少させるために室温で更に3時間インキュベーションする。

【0027】抗体の共有結合のために、溶融シリカ毛管は最初に3-アミノプロピルトリメトキシシラン官能性により変性される。グルタルアルデヒドは、毛管表面に抗体を結合させるために使用される。

【0028】抗体塗布長さ

毛管塗布長さは好ましくは、抗体溶液の注入されたプラグの長さに等しく、そしてカラム寸法、媒体の粘度及び適用圧力が知られている場合には、計算することができる。それらは、毛管の長さでFA水溶液の連続注入部の漏出時間との間の関係の決定により評価することもできる。抗体溶液の粘度は他の水溶液の粘度と相違しないと仮定すると、注入時間を基準として注入されたプラグの長さを計算することができる。

【0029】塗布毛管と未塗布毛管とのカップリング

7cm長さの塗布毛管を30ないし40cm長さの未塗布の溶融シリカ毛管にカップリングさせる（両毛管の内径は50μm又は75μmの何れかである）。ベックマン(Beckman)毛管カッターを用いて、又は研磨シートを用いて、毛管末端部を研磨するために、接合ホルダー(messing holder)の手段により毛管を保持してよい。このようにして、死容積のないカップリングを得ることができる。顕微鏡の手段により、毛管末端部の表面を検査することができる。毛管を位置決めするための最も簡単な方法は、各々、内径50ないし75μmの毛管のために直径40ないし70μmの金属ワイヤーを使用し、次いで前記ワイヤーを7cm塗布毛管を通して且つ他に1-2cm溶融シリカ毛管内に押圧することである。末端部

の変形を避けるために、金属ワイヤーが鋭いナイフにより切断されるということが基本である。前記ワイヤーを曲げることは、同様に避けるべきである。電子印刷のための基板として通常使用されるガラス繊維板10×15×2mmが、深さ360μmのV字形(90度)溝と共に、毛管の位置決めのために使用されてよい。溝内に接続された毛管を位置決めし且つ先端部に250μm厚のデッキガラスを置いた後に、カチオボンド(Katiobond; 商標名; ドイツ国、グラフェルフィン(Grafelfin)のデオ(Delo)社製)の手段により、UV-重合体、非流動接着剤、二箇所の毛管末端部が一緒に接着される。次いで、オプチキュアライトガン[Opticure light gun; 商標名; アメリカ合衆国、ニュージャージー、ニューブランズウィック(New Brunswick)のノーランド(Norland)社製]を用いて、2-4分間カップリング装置を照射する。完全な重合を行うためには、毛管を使用する前に1時間待つのが都合がよい。照射後、前記ワイヤーは毛管から抜き出すことができる。

【0030】毛管系の第一ステージの内側壁面における抗体の安定性及び結合性は、固定化の種類及び毛管系を横切る電場によっては、都合がよいことに影響されない。毛管系の第一ステージの一方のゾーン内又は分離ゾーン内の何れかで混合された異なる抗体の固定化は、組み合わされたマルチアナライトバイオアフィニティーアッセイ及び毛管電気泳動分析(combined multianalyte bioaffinity assay and capillary electrophoresis analysis)を発展させる。バイオアフィニティーアッセイ分析及び毛管電気泳動分析の両方の利点を使用される。従来技術の不利益を克服する本発明は、容易に適用することができ且つ高い分析感度をもたらす装置及び方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の組み合わされたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための装置の一実施態様を説明するための図である。

【図2】本発明の組み合わされたバイオアフィニティーアッセイ及び電気泳動分離のための方法の一実施態様において、毛管系の第一ステージ内に注入された未標識分析物分子Mと標識分析物分子Lとの混合物が、毛管系の内側壁面上の分子認識要素Aと相互作用する状態を説明するための図である。

【図3】図2の工程の次の洗浄工程において、標識分析物分子Lの非結合フラクション及び未標識分析物分子Mの非結合フラクションが毛管から除去される状態を説明するための図である。

【図4】図3の工程の次の工程において、標識分析物分子Lの結合フラクション及び未標識分析物分子Mの結合フラクションが分子認識要素Aから分離される状態を説明するための図である。

【図5】図4の工程の次の工程において、第二毛管ステ

11

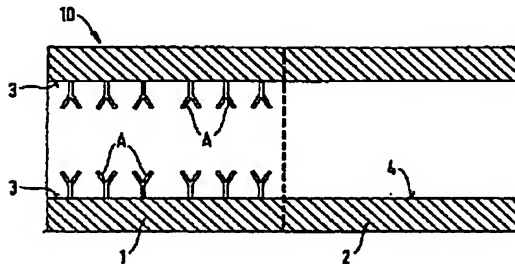
ージの内側の電場内により、標識分析物分子Lと未標識分析物分子Mとが分離される状態を説明するための図である。

【図6】図5の工程において、標識分析物分子Lと未標識分析物分子Mとが完全に分離された状態を説明するための図である。

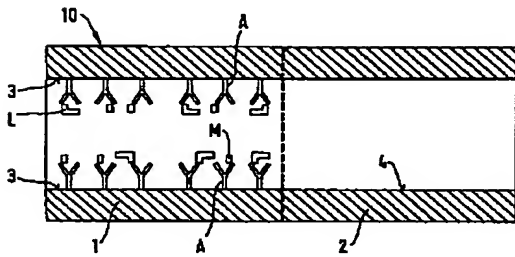
【符号の説明】

1 第一ステージ（又は、毛管、第一毛管ステージ、第

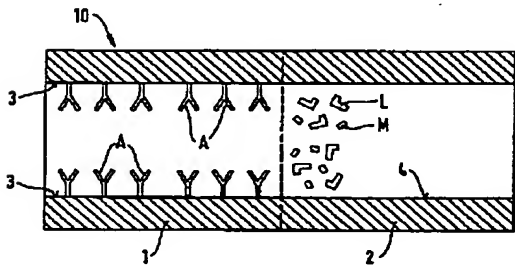
【図1】



【図3】



【図5】



12

一管)

2 第二ステージ（又は、毛管、第二毛管ステージ、第二管）

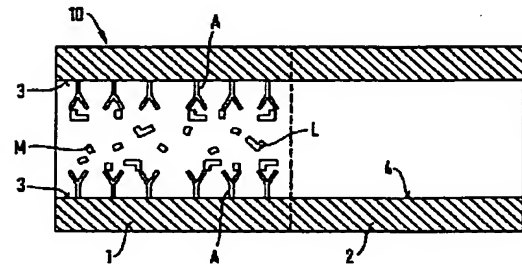
3, 4 内側壁面（又は、毛管壁面）

10 本発明の装置

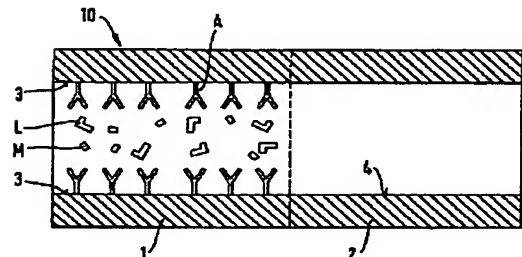
A 分子認識要素

L, M 分析物分子

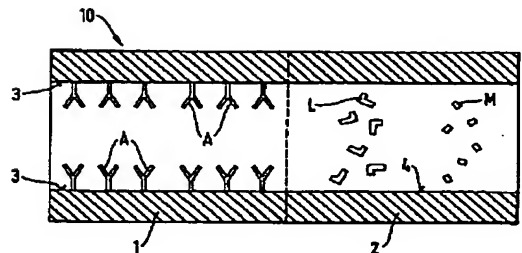
【図2】



【図4】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 ペーター オロズラン
スイス国, 4053 バーゼル, デルスベルゲ
ラレー 11/3

(72)発明者 アラン パウルス

(8)

特開平 7-311198

ドイツ連邦共和国, 79423 ハイターシャ
イム, シュヴァルツヴァルトストラーセ
9

(72)発明者 カルロ エス. エッフェンハウザー
ドイツ連邦共和国, 79756 ヴァイル ア
ム ライン, シュトザッカーストラーセ
18